" نهال و بذر"
جلد ٢٤ ، شماره ٤، سال ١٣٨٧

پرآوری پینه‌های رویان‌زا، ایجاد رویان بدنی و باززائی گیاه در میخک (*Dianthus caryophyllus* L.)

Proliferation of Embryogenic Callus, Induction of Somatic Embryo and Plant Regeneration in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)

امید کرمی[1]، گونا کریمی کردستانی[2] و محمد محمدی[1]

۱- به ترتیب مربی و کارشناس، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۲- کارشناس ارشد، عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی کردستان، سنندج

تاریخ دریافت: ۱۳۸٦/۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۱/۲۹

چکیده

کرمی، ا.، کریمی کردستانی، گ.، و محمدی، م. ۱۳۸۷. پرآوری پینه‌های رویان‌زا، ایجاد رویان بدنی و باززائی گیاه در میخک (*Dianthus caryophyllus* L.). **نهال و بذر ۲٤**: ۷۴۸-۷۳۹.

یکی از مهم‌ترین جنبه‌های مفید رویان‌زائی بدنی پرآوری پینه‌های رویان‌زا و تبدیل آن‌ها به گیاه طبیعی است. هدف از این تحقیق، پرآوری پینه‌های رویان‌زا و سپس باززائی و تولید گیاهچه طبیعی در گیاه میخک ارقام Nelson وSpirit بود. شرایط لازم برای پرآوری پینه‌های رویان‌زا در دو رقم میخک حاصل شد. محیط کشت MS دارای ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA برای‌ایجاد کالوس رویان‌زا در هر دو رقم استفاده شد. پرآوری پینه‌های رویان‌زا روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف پیکلورام شامل ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ٤ و ٦ میلی‌گرم در لیتر در هر دو رقم حاصل شد. بیشترین پرآوری پینه‌ها روی محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام در هر دو رقم مشاهده شد. با افزایش دفعات واکشت پرآوری درصد قطعات پینه‌هائی که مجدداً به صورت پینه رویان‌زا پرآوری می‌شدند در هر دو رقم افزایش یافت. پینه‌های پرآوری شده به محیط‌های کشت MS حاوی غلظت مختلف مانیتول شامل ۱۵، ۳۰، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ گرم در لیتر بدون هورمون منتقل شدند. بیشترین رویان‌زائی روی محیط کشت حاوی۹۰ گرم در لیتر مانیتول در هر دو رقم حاصل شد. وقتی که رویان‌های لپه‌ای به محیط کشت MS ۱/۲ بدون تنظیم کننده رشد انتقال داده شدند به صورت گیاهچه باززا شدند. گیاهچه‌های به دست آمده به ارتفاع ۷۰ میلی‌متر در شرایط گلخانه به طور عادی مراحل رشد خود را ادامه دادند.

واژه‌های کلیدی: میخک، پرآوری، پینه، رویان بدنی، پیکلورام، مانیتول.

نویسنده مسئول: hiva@basu.ac.ir

مقدمه

میخک (*Dianthus caryophyllus*) گیاهی دولپه و یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی دنیا است که هم به جهت زیبایی و گوناگونی رنگ و هم از نظر اقتصادی از اهمیت قابل توجهی برخودار است (Burich *et al.*, 1996). محدودیت‌های موجود در روش‌های به‌نژادی سنتی (تلاقی و گزینش) به ویژه انتقال خصوصات ژنتیکی از دیگر موجودات به گیاهان و داشتن ویژگی‌های هتروزیگوتی بالا در گیاه میخک باعث شده است که کاربرد فنون جدید سلولی مولکولی (انتقال ژن و انتخاب سلول) جهت اصلاح خصوصیات اقتصادی این گیاه ضرورت پیدا کند. کاربردی شدن فنون مولکولی خود نیازمند توسعه روش‌های مختلف کشت بافت است. کشت بافت گیاه میخک اهمیت قابل توجهی برای تولید پایه‌های مادری عاری از ویروس را دارد.

از رویان‌زائی بدنی به عنوان ابزاری برای مطالعات بنیادی نظیر بیوشیمی، فیزیولوژی، گیاهشناسی مرفولوژی و تشریح و نیز از فنون و روش های بیوتکنولوژی برای انتقال ژن (Gene transfer)، حفظ ژرم‌پلاسم (Germplasm conservation)، تولید بذر مصنوعی (Synthetic seed)، تولید متابولیت‌های ثانویه (Secondary metabolites)، ایجاد تنوع ژنتیکی (Genetic variations) و حذف ویروس (Virus Free) از گیاه استفاده کرد (Vicient *et al.*, 1998).

فری و همکاران (Fery *et al.*, 1992) برای اولین بار ایجاد رویان بدنی را در گیاه میخک گزارش کردند. یان چوا و همکاران (Yantcheva *et al.*, 1998) ایجاد رویان بدنی مستقیم از مسیر کالوس را در گیاه میخک گزارش کردند. کرمی (Karimi *et al.*, 2006) برای اولین بار ایجاد پینه‌های رویان‌زا را در میخک گزارش کردند. یکی از مهم‌ترین جنبه‌های مفید رویان‌زائی بدنی برای کاربردهایی از قبیل ریزازدیادی و انتقال ژن، پرآوری کشت‌های رویان‌زا است (Merkle *et al.*, 1995). هدف این تحقیق پرآوری پینه‌های رویان‌زا و باززائی آن‌ها به منظور تولید گیاهچه‌های طبیعی بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط کشت

این تحقیق روی دو رقم میخک (Nelson و Spirit) که از کشور هلند وارد شده و در شهرستان محلات کشت و کار می‌شوند انجام شد. جوانه‌های گل نارس به طول ۱/۵-۱ سانتی‌متر از گیاهان در حال رشد در گلخانه برداشت شدند و به مدت سه هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سطح خارجی جوانه‌ها با قرار دادن در محلول ۲٪ هیپوکلریت سدیم (سفیدکننده تجارتی وایتکس) حاوی ۵/۲۵٪ کلر فعال به مدت ۲۰ دقیقه گندزدایی و سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو شد. کاسبرگ‌ها و نهنج از جوانه‌ها حذف شدند و گلبرگ‌ها به قطعاتی به طول تقریبی ۴-۳

میلی‌متر بریده و روی محیط کشت قرار داده شدند. همه محیط‌های کشت در شرایط محیطی ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ و ۸ ساعت نور و تاریکی نگهداری شدند. pH همه محیط‌های کشت پیش از اتوکلاو کردن با استفاده از NaOH در سطح ۵/۸ تنظیم شد و برای محیط‌های کشت نیمه جامد از آگار (Agar) به میزان ۷ گرم در لیتر استفاده شد.

پرآوری پینه‌های رویان‌زا

مطابق دستورالعمل کرمی و همکاران (۲۰۰۶) پینه‌های رویان‌زای به دست آمده از ریزنمونه‌های گلبرگ این دو رقم میخک روی محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) محتوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid) همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA (6-Benzylaminopurine) و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز ایجاد شدند. برای پرآوری پینه‌های رویان‌زا، پینه‌های اولیه از ریزنمونه‌های گلبرگ جدا شدند و بعد از تقسیم به قطعات کوچک به وزن تقریبی هر یک ۲۰ میلی‌گرم به محیط‌های کشت MS محتوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هورمون‌های 2,4-D، پیکلورام (Picloram)، نفتالین استیک اسید NAA، BA و کینتین (Kinetin) هر یک در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم به صورت جدا و در ترکیب با هم (۰/۵ میلی‌گرم BA در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D یا پیکلورام) منتقل شدند. بعد از پنج هفته درصد پینه‌های رویان‌زای به دست آمده از محیط‌های حاوی ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام که مجدداً به صورت پینه رویان‌زا پرآوری شده بودند شمارش شدند. حدود سی قطعه پینه رویان‌زا در هر تکرار و چهار تکرار در هر تیمار برای این مرحله از آزمایش منظور شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS اجرا شد. پرآوری پینه‌های رویان‌زا برای چهار چرخه پشت سر هم و با طول هر چرخه سه هفته روی محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام تکرار شد.

ایجاد رویان از پینه‌های پرآوری شده

برای ایجاد رویان از پینه‌های پرآوری شده، پینه‌های رویان‌زا از محیط‌های پرآوری حاوی ۰/۵ میلی‌گرم پیکلورام برداشته شدند و به محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به ترتیب حاوی ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ گرم در لیتر مانیتول بدون هورمون (Hormone free) منتقل شدند. حدود ۲۵۰ میلی‌گرم پینه، ده قطعه پینه در هر تکرار، و چهار تکرار در هر تیمار برای این مرحله از آزمایش منظور شد. بعد از پنج هفته تعداد رویان‌های ایجاد شده بر روی پینه‌های رویان‌زای پرآوری شده شمارش شدند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS اجرا شد.

جوانه‌زنی

برای جوانه‌زنی، رویان‌های لپه‌ای به محیط کشت MS۱/۲ حاوی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز فاقد تنظیم‌کننده رشد منتقل شدند. پس از چهار هفته، تعداد رویان‌های باززایی شده شمارش شدند.

انتقال گیاهچه‌ها به خاک

گیاهچه‌های با طول تقریبی ۷۰ میلی‌متر، از محیط کشت جوانه‌زنی برداشته شده و پس از شستشوی ریشه آن‌ها توسط آب مقطر استریل به گلدان‌های حاوی مخلوطی از پیت، ماسه و خاک باغچه با نسبت حجمی ۱:۱:۱ منتقل شدند و در شرایط محیطی ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ و ۸ ساعت نگهداری شدند و سپس برای ادامه رشد در گلخانه نگهداری شدند.

نتایج و بحث

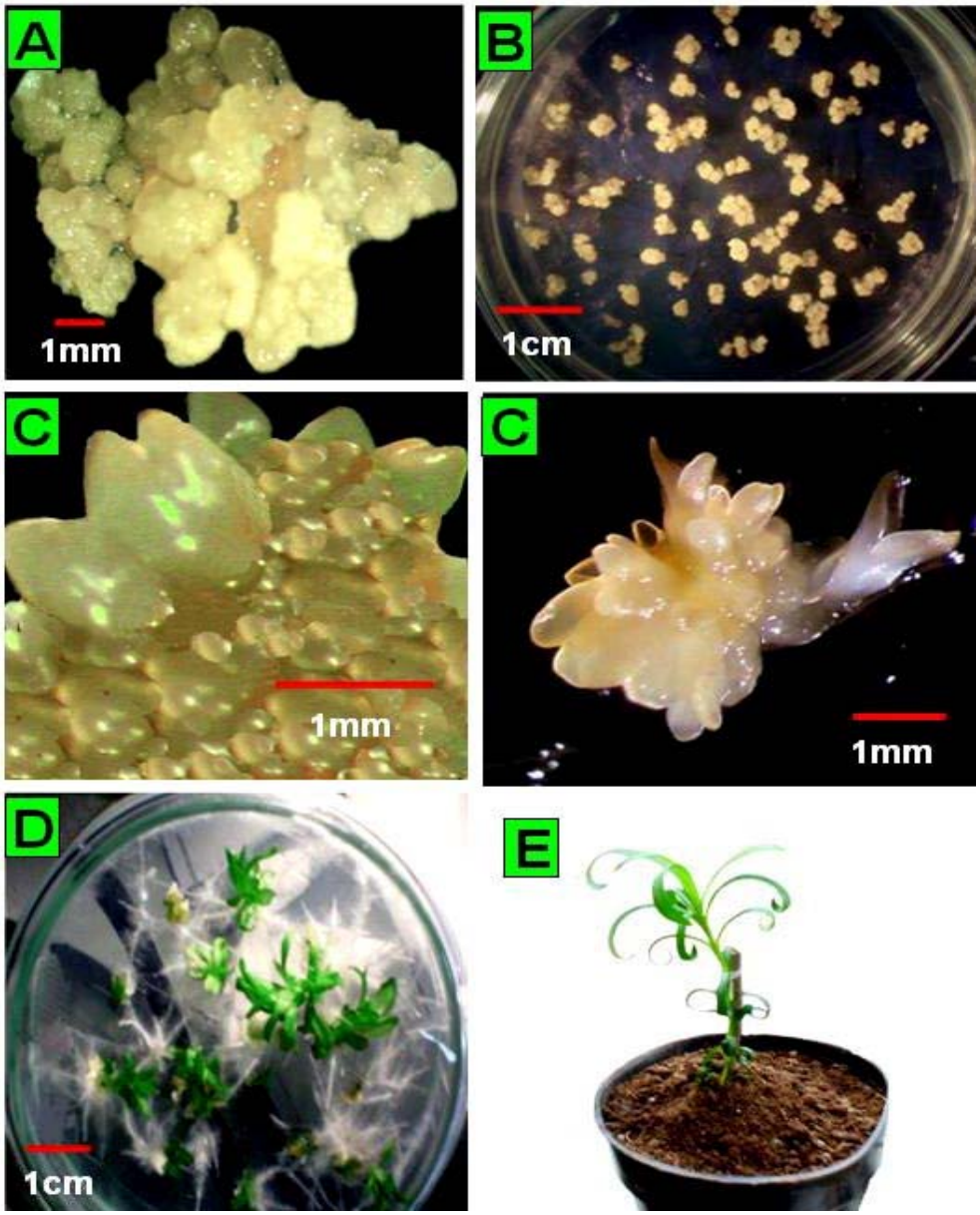
پرآوری پینه‌های رویان‌زا

بعد از انتقال پینه‌های رویان‌زای اولیه به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D و NAA، در هر دو رقم همه پینه‌های رویان‌زا به پینه‌های آبکی تبدیل شدند. بعد از انتقال پینه‌های آبکی به محیط ایجاد رویان، هیچ ساختار رویانی روی آن‌ها مشاهده نشد. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که دو هورمون NAA و 2,4-D پینه‌های رویان‌زای این دو رقم میخک را به پینه‌های غیر رویان‌زا تبدیل می‌کنند. اگرچه در گزارش‌های قبلی رویان‌زائی بدنی گیاه میخک، ایجاد پینه‌های رویان‌زا و رویان بدنی با استفاده از 2,4-D گزارش شده است (Yantcheva *et al.*, 1998؛ Karami *et al.*, 2006؛ Fery *et al.*, 1992). اما نتایج این بررسی نشان می‌دهد که هورمون‌های 2,4-D و NAA برای پرآوری پینه‌های رویان‌زای این ارقام مناسب نیست.

بعد از انتقال پینه‌های رویان‌زا به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف BA و کینتین، ۹۵ درصد از قطعات پینه رویان‌زای بدون پرآوری در هر دو رقم به صورت اندام هوائی پرآوری شدند و سایر قطعات پینه به صورت کالوس‌های سبز رنگ تکثیر شدند. در گزارش‌های متعددی پرآوری ریزنمونه‌های برگ، ساقه و گلبرگ گیاه میخک به طور مستقیم (بدون پینه) با استفاده از BA و کینتین گزارش شده است (Nakona *et al.*, 1994؛ Fisher *et al.*, 1993؛ Nontvaswatsri *et al.*, 2002؛ Van Altvorst *et al.*, 1995).

بعد از انتقال پینه‌های رویان‌زا به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف پیکلورام، برخی از قطعات پینه رویان‌زا مجددا به صورت پینه‌های رویان‌زا در هر دو رقم پرآوری شدند (شکل ۱ ,A) و سایر قطعات به رویان و پینه‌های آبکی غیررویان‌زا تبدیل شدند.

در جدول ۱ اثر مقادیر مختلف پیکلورام بر درصد قطعات پینه‌های رویان‌زا پرآوری شده در دو رقم میخک Spirit و Nelson نشان داده شده است. به جزء غلظت ۱و ۲ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام در رقم Spirit در همه غلظت‌ها تفاوت



شکل ۱- (A): پرآوری پینه‌های رویان‌زا چهار هفته بعد ازکشت روی محیط کشت MS محتوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر. پیکلورام. (B): پرآوری پینه‌های رویان‌زا در چرخه چهارم روی محیط کشت MS محتوی ۲ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام. (C): تشکیل رویان بدنی کروی و قلبی شکل بعد از دو هفته روی محیط کشت MS حاوی ۶۰ گرم در لیتر مانیتول (D): تشکیل رویان بدنی اژدری و لپه ای شکل بعد از چهار هفته روی محیط کشت MS حاوی ۶۰ گرم در لیتر مانیتول (E): جوانه زنی رویان بدنی دو هفته بعد از کشت در محیط کشت MS ۱/۲فاقد تنظیم کننده رشد. (F): توسعه گیاهچه در گلدان بعد از پنج هفته.

Fig. 1. **A**: Proliferation of embryogenic callus on MS medium containing 0.5 mg 1^{-1} picloram four weeks after culture. **B**: Proliferation of embryogenic callus on MS medium containing 2 mg 1^{-1} picloram in four cycles. **C**: Somatic embryogenesis at globular and heart stage on medium containing 60 g 1^{-1} mannitol two weeks after culture. **D**: Somatic embryogenesis at cotyledony and torpedo stage on medium containing 60 g 1^{-1} mannitol four weeks after culture. **E**:Germination of somatic embryos on half-strength MS hormone free after two weeks. **F**: A potted plant in greenhouse after two weeks.

جدول ۱: اثر غلظت‌های مختلف پیکلورام روی پرآوری پینه‌های رویان‌زا در دو رقم میخک، پنج هفته بعد از کشت

Table 1. Effect of different concentrations of picloram on proliferation of embryogenic callus in two cultivars of carnation after five weeks

پیکلورام Picloram (mgl^{-1})	درصد پینه‌های پرآوری شده Percentage of proliferated embryogenic callus	
	Nelson	Spirit
0.2	33 c	24 c
0.5	57 a	45 a
1.0	41 b	32 b
2.0	31 c	31 b
4.0	20 d	13 d
6.0	12 e	7 e
Mean genotype	32 a	25 b

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون نشانگر معنی دار نبودن اختلاف آن‌ها است. ($P< 0.05$).

Means with similar letters in each column are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P< 0.05$).

معنی‌داری در پرآوری کالوس‌ها در هر دو رقم مشاهده شد. با افزایش غلظت پیکلورام در محیط کشت درصد قطعات پینه رویان‌زای پرآوری شده به طور معنی‌دار ($P< 0.05$) در هر دو رقم کاهش نشان داد. در هر دو رقم بیشترین درصد قطعات پینه رویان‌زای پرآوری شده روی محیط‌های کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام مشاهده شد و کمترین درصد قطعات پینه رویان‌زای پرآوری شده روی محیط‌های کشت حاوی ۶ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام مشاهده شد. اگر چه نوع پاسخ رقم‌ها به تغییر غلظت‌های مختلف پیکلورام تقریباً یکسان بود اما پاسخ رقم‌ها به درصد پرآوری پینه‌های رویان‌زا در غلظت‌های گوناگون متفاوت بود و بیشترین میزان پرآوری در رقم Nelson به دست آمد (جدول ۱).

در گندم دوروم (*Triticum durum*) توسط He and Lazzeri (2001) و در ارزن (*Miglium* sp.) توسط Preeti and Kothari (2004) پرآوری پینه‌های رویان‌زا با استفاده از پیکلورام گزارش شده است. اگر چه با استفاده 2,4-D ایجاد رویان و پینه رویان‌زا گزارش شده است (Karami *et al.*, 2006؛ Fery *et al.*, 1992؛ Yantcheva *et al.*, 1998). اما تاکنون پرآوری پینه‌های رویان‌زا در گیاه میخک گزارش نشده بود. با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان پیکلورام را به عنوان یک اکسین مطلوب برای پرآوری پینه‌های رویان‌زا برای میخک پیشنهاد کرد.

در جدول ۲ اثر تکرار چرخه پرآوری پینه‌های رویان‌زا روی محیط کشت MS حاوی

جدول ۲- اثر تکرار چرخه پرآوری پینه‌های رویان‌زا بر افزایش بازده پرآوری در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر پیکلورام از دو رقم میخک

Table 2. Effect of repeated cycle on proliferation of embryogenic callus in culture medium containing 0.5 mg l^{-1} of picloram from two cultivars of carnation

Repeated cycle	چرخه تکرار شده	درصد پینه‌های پرآوری شده Percentage of proliferated embryogenic callus	
		Nelson	Spirit
Cycle 1	چرخه ۱	57 d	45 d
Cycle 2	چرخه ۲	74 c	70 c
Cycle 3	چرخه ۳	88 b	85 b
Cycle 4	چرخه ۴	98 a	100 a

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون نشانگر معنی دار نبودن اختلاف آن‌ها است ($P< 0.05$).

Means with similar letters in each column are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P< 0.05$).

۰/۵ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام در دو رقم Spirit و Nelson میخک نشان داده شده است. با افزایش تکرار چرخه پرآوری درصد قطعات پینه که مجددا به صورت پینه رویان‌زا پرآوری شدند به طور معنی‌داری ($P< 0.05$) در هر دو رقم افزایش نشان داد. نوع پاسخ رقم ها به تکرار چرخه‌ها تقریباً یکسان بود و در چرخه چهارم پرآوری تمام قطعات در هر دو رقم حاصل شد (شکل۱، B) با توجه به این نتایج می‌توان نتیجه گرفت که تکرار چرخه پرآوری روی محیط پرآوری، پینه‌های رویان‌زا را برای پرآوری شدن سازگار می‌کند.

ایجاد رویان از پینه‌های پرآوری شده

دو هفته بعد از انتقال پینه‌های پرآوری شده به محیط کشت MS بدون هورمون و محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف مانیتول رویان بدنی کروی و قلبی شکل روی پینه‌های در دو رقم Spirit و Nelson میخک مشاهده شد (شکل۱، C). بعد از سه هفته، بیشتر رویان‌های ایجاد شده روی پینه‌ها به صورت رویان‌های اژدری و لپه‌ای توسعه یافتند (شکل۱، D).

در جدول ۳ اثر مقادیر مختلف مانیتول بر تعداد رویان ایجاد شده از پینه‌های پرآوری شده در دو رقم Spirit و Nelson میخک نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می‌شود با افزودن مانیتول به محیط کشت، تعداد رویان‌های تشکیل شده روی پینه‌های رویان‌زا به طورقابل ملاحظه‌ای ($P< 0.05$) در هر دو رقم افزایش یافته بود. بین همه غلظت‌های مانیتول تفاوت معنی‌داری در تعداد رویان‌های ایجاد در هر دو رقم مشاهده شد. روی محیط‌های کشت حاوی

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف مانیتول بر تعداد رویان‌های ایجاد شده از پینه‌های رویان‌زای پرآوری شده در دو رقم میخک پنج هفته بعد از کشت

Table 3. Effect of different mannitol concentrations on induction of somatic embryos from proliferated embryogenic callus in two cultivars of carnation after five weeks

مانیتول Mannitol ($g1^{-1}$)	تعداد رویان‌های ایجاد شده روی پینه‌های پرآوری شده Number of embryos induced on of proliferated embryogenic callus	
	Nelson	Spirit
15	105 e	119 e
30	147 d	135 d
60	211 b	186 b
90	223 a	205 a
120	175 c	156 c
Mean genotype	172 a	160 b

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون نشانگر معنی دار نبودن اختلاف آن‌ها است ($P< 0.05$).

Means with similar letters in each column are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P< 0.05$).

۹۰ گرم در لیتر مانیتول بیشترین تعداد رویان بدنی در هر دو رقم تشکیل شد. در غلظت پائین مانیتول (۱۵ گرم در لیتر) تعداد رویان‌های تشکیل شده در مقایسه با سایر غلظت‌ها در هر دو رقم پائین‌تر بود. اثر غلظت های مختلف مانیتول روی ایجاد رویان بدنی (در این تحقیق) با اثر غلظت ساکارز روی ایجاد رویان بدنی که توسط کرمی و همکاران (۲۰۰۶) گزارش شده مشابه بود.

اگرچه در رویان‌زائی بدنی از قندها بیشتر به عنوان منبع تامین کربن به استفاده شده است اما در برخی از بررسی‌های اثبات شده است افزایش رویان‌زائی بدنی در نتیجه افزایش غلظت قند تنها به خاطر تامین کربن سلول گیاه نیست بلکه این افرایش بازده با تغییرات اسمزی ناشی افزایش قند در محیط کشت نیز ارتباط دارد(Litze, 1995؛ Lou and Kako, 1986؛ Nakagvwa *et al.*, 2001). بنابراین می‌توان گفت که افزایش تعداد رویان‌های بدنی در نتیجه افزایش غلظت مانیتول (در این مطالعه) ممکن است در نتیجه پتانسیل اسمزی ناشی از افزایش مانیتول در محیط باشد.

اگر چه نوع پاسخ رقم‌ها به تغییر غلظت‌های مختلف مانیتول تقریباً یکسان بود اما پاسخ رقم‌ها به تعداد رویان‌های ایجاد شده در غلظت‌های مانیتول متفاوت بود و بیشترین میزان رویان‌زایی در رقم Nelson به دست آمد (جدول ۳). یان‌چوا و همکاران (۱۹۹۸) پاسخ متفاوت ارقام میخک در رویان‌زایی مستقیم را گزارش کرده‌اند. به هر حال این قبیل تفاوت‌ها ممکن است به میزان توانایی عناصر کلیدی در میسر رویان‌زایی ارتباط داشته باشد که در بین رقم‌ها

متفاوت است.

جوانه‌زنی

دو هفته بعد از انتقال رویان‌های لپه‌ای به محیط کشت MS ½ به صورت گیاهچه باززا شدند (شکل ۱، E). در هر دو رقم رویان‌های بدنی با فراوانی نسبتاً بالا (حدود ۸۰ درصد) باززا شدند. حدود ۷۵ درصد از گیاهچه‌های منتقل شده به گلدان‌های حاوی پیت، ماسه و خاک باغچه به گیاه کامل تبدیل شدند (شکل ۱، F).

در این بررسی پینه‌های رویان‌زای میخک روی محیط کشت حاوی پیکلورام پرآوری شدند و پینه‌های پرآوری شده به طور مطلوب روی محیط کشت حاوی مانیتول به رویان بدنی تبدیل شدند و رویان‌ها بدنی به دست آمده به طور پر بازده به صورت گیاهچه کامل باززا شدند. در یک نگاه کلی می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که در این بررسی گیاه میخک به روش مطلوبی باززا شده است و از نتایج آن می‌توان برای تولید بذر مصنوعی، تولید دورگ های بدنی و دست ورزی‌های ژنتیکی گیاه میخک استفاده کرد. تکثیر تجاری گیاه میخک از مسیر رویان‌زائی بدنی، بررسی پرآوری پینه‌های رویان‌زا و تبدیل آن‌ها به رویان بدنی از طریق محیط کشت مایع در مقایسه با پژوهش انجام شده پیشنهاد می‌شود.

References

Burich, G. A., Mercun, P., Benedtti, L., and Giovannini, A. 1996. Transformation method applicable to ornamental plants. Plant Tissue Culture and Biotechnology 12: 94-104.

Fery, L., Saranga, Y., and Bjanik, J. 1992. Somatic embryogenesis in carnation. HortScience 27:63–65.

Fisher, M., Zin, M., and Vainstein, A. 1993. An efficient method for adventitious shoot regeneration from culture carnation petals. Scientia Horticulturae 53: 231-237.

He, G. Y., and Lazzeri, P. A. 2001. Improvement of somatic embryogenesis and plant regeneration from durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum* Desf.) scutellum and inflorescence cultures. Euphytica 119: 369–376.

Karami, O., Deljou, A., Esna-Ashari, M., and Ostad-Ahmadi, P. 2006. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Scientia Horticulturae 110: 340–344.

Litze, R.E. 1986. Effects of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension culture. Journal of American Society of Horticultural Science 11: 969-972.

Lou, H., and Kako, S. 1995. Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. Scientia Horticulturae 64:11-20.

Merkle, S. A., Parrott., W. A., and Flin, B. S. 1995. Morphogenic aspect of somatic emberyogenesis. pp. 155-203. In: Thorpetaed *In vitro* Embryogenesis in Plant. Klauwer Academic Publishers Dordrecht Bosta London.

Murashige, T., and Skoog, F. A. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 154: 73–79.

Nakagvwa, H., Saijyo, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., Kako, S., and Ito, A. 2001. Effect of sugar and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. Scientia Horticulturae 90: 85-92

Nakano, M., Hoshio, Y., and Mii, M.1994. Adventitious shoot regeneration from cultured petal explants of carnation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36: 15-19.

Nontvaswatsri, C., Fukai, S., Touma, T., and Gol., M. 2002. Comparison of adventitious shoot formation from node and leaf explant of various carnation *Dianthus caryophyllus* L. cultivars. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 77: 520-525.

Preeti, K., and Kothari, S. L. 2004. *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on tissue initiation and regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 73–79.

Van Altvorst, A.C., Yancheva, A., and Dons, H.1995. Cell within the nodal region of carnation shoots exhibits a high potential for adventitious shoot formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 45: 151-157.

Vicient, M.C., and Martinez, F. X. 1998. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. Revista Brasileira de Fisiologia 10: 1-12.

Yantcheva, A., Vlahova, M., and Antanassov, A. 1998. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant Cell Reproduction 18:148–153.